



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C07C 235/06, 233/05, C07J 9/00, A61K 47/48, 48/00, C12N 15/88		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/17823 (43) Date de publication internationale: 13 juin 1996 (13.06.96)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01595</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 décembre 1995 (04.12.95)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 94/14596 5 décembre 1994 (05.12.94) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BYK, Gerardo [IL/FR]; 3, impasse Eugène-Delacroix, F-94000 Créteil (FR). DU-BERTRET, Catherine [FR/FR]; 14, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). SCHERMAN, Daniel [FR/FR]; 50, rue du Disque, F-75645 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction des Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).</p>			
<p>(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>			

(54) Title: LIPOPOLYAMINES AS TRANSECTIION AGENTS AND PHARMACEUTICAL USES THEREOF

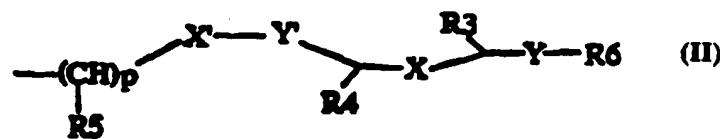
(54) Titre: LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSECTIION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

(57) Abstract

Cationic lipids of general formula (I), wherein m is an integer from 2 to 6 inclusive; n is an integer from 1 to 9 inclusive, preferably 1-5, where, when n is 2-9, a single R grouping other than hydrogen is present in the general formula, and m has variable or identical values within the groupings (a) or -(CH₂)_m; R is a hydrogen atom or a radical of general formula (II), wherein X and X', which are the same or different, are an oxygen atom, a methylene grouping -(CH₂)_q where q is 0, 1, 2 or 3, or an amino grouping -NH- or -NR'-, where R' is a C₁₋₄ alkyl grouping; Y and Y', which are the same or different, are a methylene grouping, a carbonyl grouping or a C=S grouping; R₃, R₄ and R₅, which are the same or different, are a hydrogen atom or an optionally substituted C₁₋₄ alkyl radical, and p is 0-5; and R₆ is a cholesterol derivative or an alkylamino grouping -NR₁R₂, where R₁ and R₂ are, independently of each other, a straight or branched, saturated or unsaturated C₁₂₋₂₂ aliphatic radical. Pharmaceutical compositions containing said lipids, and their uses for transfecting nucleic acids whether *in vitro* or *in vivo* in cells, are also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à des lipides cationiques de formule générale (I), dans laquelle m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement, n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec, lorsque n est compris entre 2 et 9, un seul groupement R, différent de l'hydrogène, de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou identiques au sein des différents groupements (a) ou -(CH₂)_m, R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale (II), dans laquelle X et X' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'oxygène, un groupement méthylène -(CH₂)_q avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino -NH- ou -NR'- avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄, Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S, R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5, R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatic, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection d'acides nucléiques, *in vitro* ou *in vivo* dans des cellules.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Sabah
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

LIPOPOLYAMINES COMME AGENTS DE TRANSFECTION ET LEURS APPLICATIONS PHARMACEUTIQUES

5 La présente invention concerne de nouveaux composés apparentés à la famille des lipopolyamines, des compositions pharmaceutiques les contenant et leurs applications pour la transfection *in vivo* et/ou *in vitro* d'acides nucléiques.

10 De nombreuses maladies génétiques sont associées à un défaut d'expression et/ou une expression anormale, c'est à dire déficiente ou excessive, d'un ou plusieurs acides nucléiques. La thérapie génique a pour principal objectif de corriger ce type d'anomalies génétiques par le biais de l'expression cellulaire *in vivo* ou *in vitro* de gènes clonés.

15 Aujourd'hui, plusieurs méthodes sont proposées pour la délivrance intracellulaire de ce type d'information génétique. L'une d'entre elles, en particulier, repose sur l'emploi de vecteurs chimiques ou biochimiques. Les vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'ADN à transfacter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, à travers les deux membranes nucléaires.

20 Un progrès important a été accompli dans ce mode de transfection avec le développement d'une technologie basée sur l'emploi d'un lipide cationique. Il a ainsi été mis en évidence qu'un lipide cationique chargé positivement, le chlorure de N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (DOTMA), interférait, sous la forme de liposomes ou de petites vésicules, spontanément avec de l'ADN, qui est chargé négativement, pour former des complexes lipides-ADN, capables de fusionner avec les membranes cellulaires, et permettait ainsi la délivrance intracellulaire de l'ADN. Toutefois, bien que cette molécule soit efficace au niveau de la transfection, elle présente le désavantage d'être non biodégradable et de posséder un caractère毒ique à l'égard des cellules.

25 Depuis le DOTMA, d'autres lipides cationiques ont été développés sur ce modèle de structure : groupe lipophile associé à un groupement amino via un bras dit "spacer". Parmi ceux-ci, on peut plus particulièrement citer ceux comprenant à titre de groupement lipophile deux acides gras ou un dérivé du cholestérol, et comportant, en outre, le cas échéant, à titre de groupement amino, un groupement d'ammonium quaternaire. Les DOTAP, DOBT ou le ChOTB peuvent notamment être cités à titre représentatifs de cette catégorie de lipides cationiques. D'autres composés, comme les

30

35

DOSC et ChOSC, se caractérisent par la présence d'un groupement choline à la place du groupement d'ammonium quaternaire. En général, l'activité transfectante de ces composés demeure toutefois assez faible.

Une autre catégorie de lipides cationiques, les lipopolyamines, a également été décrite. Dans ce type de composés, le groupement cationique est représenté par le radical L-5carboxyspermine qui contient quatre groupements d'ammonium, deux primaires et deux secondaires. Les DOGS et DPPES en font notamment partie. Ces lipopolyamines sont tout particulièrement efficaces pour la transfection de cellules endocrines primaires.

En fait, un agent de transfection synthétique idéal devrait présenter un haut niveau de transfection, et ce pour un large spectre de cellules, posséder une toxicité nulle ou à défaut une toxicité très minimisée aux doses d'utilisation, et enfin, être biodégradable pour s'affranchir de tout effet secondaire au niveau des cellules traitées.

La présente invention a précisément pour objet de proposer de nouveaux composés susceptibles d'être utilisés efficacement dans la transfection *in vitro* et ou *in vivo* de cellules et notamment pour la vectorisation d'acides nucléiques.

Elle a pour premier objet des lipopolyamines, sous forme D, L ou LD et leurs sels, représentées par la formule générale I :



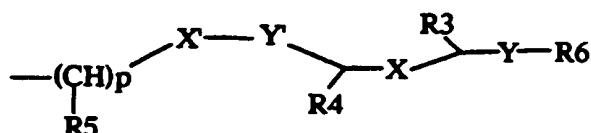
dans laquelle

- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,

25 - n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec un seul groupement R différent de l'hydrogène de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou identiques au sein des différents groupements $-\underset{\substack{| \\ \text{R}}}{(\text{CH)}_m}-$ et $-\underset{\substack{| \\ \text{R}}}{(\text{CH}_2)_m}-$,

30

- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale II:

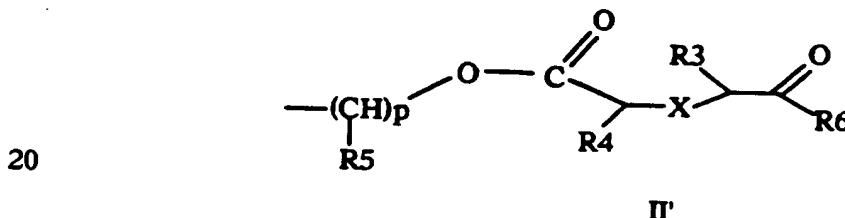


II

5 dans laquelle

- X et X' représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(CH_2)_q$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino $-NH-$ ou $-NR'$ avec R' représentant un groupement alkyle en C₁ à C₄,
- Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement C=S,
- R₃, R₄ et R₅ représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C₁ à C₄, avec p pouvant varier entre 0 et 5,
- R₆ représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino $-NR_1R_2$ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

D'un intérêt tout particulier sont les composés dans lesquels R y est représenté par la formule générale II'

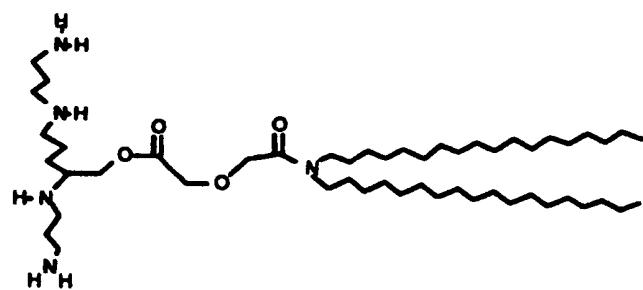


dans laquelle R₃, R₄, R₅, R₆ et p répondent aux définitions précédentes et X représente un atome d'oxygène ou un groupement $-(CH_2)_q$ avec q étant égal à zéro.

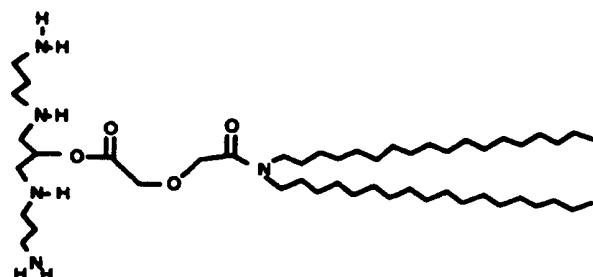
25 Cette famille de composés se caractérise notamment par la présence d'une liaison ester interne, intéressante sur le plan de la biodégradabilité.

A titre de lipopolyamines préférées selon l'invention, on peut plus particulièrement mentionner les composés suivants:

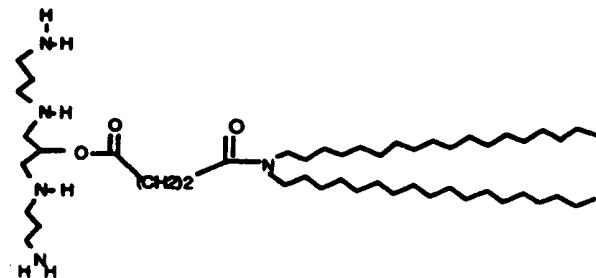
4



5



10



10 alpha.cholestéryle

15

sous la forme D, L, DL ou l'un de leurs sels.

La présente invention a également pour objet toute application thérapeutique des lipopolyamines selon l'invention, soit directement, soit au sein de compositions pharmaceutiques.

5 Comme explicité précédemment, les composés de formule générale I s'avèrent tout particulièrement intéressants pour la transfection *in vitro* et *in vivo* d'acides nucléiques. Ils compactent efficacement l'ADN et présentent avantageusement une toxicité très réduite voire nulle à l'égard des cellules traitées. En outre, ils sont biodégradables notamment par hydrolyse de leur liaison ester.

10 Pour obtenir un effet maximal des compositions de l'invention, les proportions respectives du composé de formule générale I et de l'acide nucléique sont de préférence déterminées de manière à ce que le rapport R, charges positives de la lipopolyamine considérée par charges négatives dudit acide nucléique soit optimal. Ce rapport optimal variant en particulier selon le mode d'utilisation à savoir *in vivo* ou *in vitro* et selon le type cellulaire à transfecter, il est optimisé au cas par cas. Cette optimisation relève de la compétence de l'homme de l'art.

20 Dans les compositions de la présente invention, le polynucléotide peut être aussi bien un acide désoxyribonucléique qu'un acide ribonucléique. Il peut s'agir de séquences d'origine naturelle ou artificielle, et notamment d'ADN génomique, d'ADNc, d'ARNm, d'ARNt, d'ARNr, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. Ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques.

25 Concernant plus particulièrement les acides désoxyribonucléiques, ils peuvent être simple ou double brin. Ces acides désoxyribonucléiques peuvent porter des gènes thérapeutiques, des séquences régulatrices de la transcription ou de la réPLICATION, des séquences antisens modifiées ou non, des régions de liaison à d'autres composants cellulaires, etc.

30 Au sens de l'invention, on entend par gène thérapeutique notamment tout gène codant pour un produit protéique ayant un effet thérapeutique. Le produit

protéique ainsi codé peut être une protéine, un peptide, etc. Ce produit protéique peut être homologue vis-à-vis de la cellule cible (c'est-à-dire un produit qui est normalement exprimé dans la cellule cible lorsque celle-ci ne présente aucune pathologie). Dans ce cas, l'expression d'une protéine permet par exemple de pallier une expression insuffisante dans la cellule ou l'expression d'une protéine inactive ou faiblement active en raison d'une modification, ou encore de surexprimer ladite protéine. Le gène thérapeutique peut aussi coder pour un mutant d'une protéine cellulaire, ayant une stabilité accrue, une activité modifiée, etc. Le produit protéique peut également être hétérologue vis-à-vis de la cellule cible. Dans ce cas, une protéine exprimée peut par exemple compléter ou apporter une activité déficiente dans la cellule, lui permettant de lutter contre une pathologie, ou stimuler une réponse immunitaire.

Parmi les produits thérapeutiques au sens de la présente invention, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, HARP/pléiotrophine, etc la dystrophine ou une minidystrophine (FR 9111947), la protéine CFTR associée à la mucoviscidose, les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (FR 93 04745), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, les gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, les gènes suicides (thymidine kinase, cytosine déaminase), les gènes de l'hémoglobine ou d'autres transporteurs protéiques, les gènes correspondant aux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides, de type apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), les enzymes du métabolisme comme par exemple la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique, la lécitine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, ou encore des protéines de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les récepteurs scavenger.etc.

L'acide nucléique thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent, par

exemple, être transcrtes dans la cellule cible en ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Les gènes thérapeutiques comprennent également les séquences codant pour des ribozymes, qui sont capables de détruire sélectivement des ARN cibles (EP 321 201).

10 Comme indiqué plus haut, l'acide nucléique peut également comporter un ou plusieurs gènes codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme ou l'animal une réponse immunitaire. Dans ce mode particulier de mise en oeuvre, l'invention permet donc la réalisation soit de vaccins soit de traitements immunothérapeutiques appliqués à l'homme ou à l'animal, notamment contre des microorganismes, des virus ou des cancers. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'Epstein Barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, du "syncitia forming virus, d'autres virus ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

15 Préférentiellement, l'acide nucléique comprend également des séquences permettant l'expression du gène thérapeutique et/ou du gène codant pour le peptide antigénique dans la cellule ou l'organe désiré. Il peut s'agir des séquences qui sont naturellement responsables de l'expression du gène considéré lorsque ces séquences sont susceptibles de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de 20 séquences d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus. A cet égard, on peut citer par exemple les 25 promoteurs des gènes E1A, MLP, CMV, RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, etc. Il peut aussi s'agir de promoteur, inductible ou répressible.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter, en particulier en 30 amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle. L'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé vers un compartiment particulier de la cellule.

Dans un autre mode de mise en oeuvre, la présente invention concerne des compositions comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine telle que revendiquée et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'en améliorer le pouvoir transfectant. La demanderesse a en effet montré que le pouvoir transfectant des lipopolyamines peut être de manière inattendue augmenté en présence de certains adjuvants (lipides ou protéines par exemple), capables de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique.

Plus préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent, comme adjuvant, un ou plusieurs lipides neutres. De telles compositions sont particulièrement avantageuses, notamment lorsque le rapport R est faible. La demanderesse a en effet montré que l'addition d'un lipide neutre permet d'améliorer la formation des particules nucléolipidiques et, de manière surprenante, de favoriser la pénétration de la particule dans la cellule en déstabilisant sa membrane.

Plus préférentiellement, les lipides neutres utilisés dans le cadre de la présente invention sont des lipides à 2 chaînes grasses.

De manière particulièrement avantageuse, on utilise des lipides naturels ou synthétiques, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologique. Il peuvent être choisis plus particulièrement parmi la dioleoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l' oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), les di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamines ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébrosides (tels que notamment les galactocérebrosides), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) ou encore les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).

Ces différents lipides peuvent être obtenus soit par synthèse, soit par extraction à partir d'organes (exemple : le cerveau) ou d'oeufs, par des techniques classiques bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'extraction des lipides naturels peut être réalisée au moyen de solvants organiques (voir également Lehninger, Biochemistry).

Préférentiellement, les compositions de l'invention comprennent de 0,1 à 20 équivalents d'adjuvant pour un équivalent de composé de formule générale I et, plus préférentiellement, de 1 à 5.

Les compositions selon l'invention peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, cutanée, orale, rectale, vaginale, parentérale,

intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe au niveau de l'organe désiré, ou pour une administration par

5 voie topique (sur peau et/ou muqueuse). Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de serum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Les doses d'acide nucléique utilisées pour l'injection ainsi que le nombre d'administrations peuvent être adaptées en fonction de différents

10 paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. En ce qui concerne plus particulièrement le mode d'administration, il peut s'agir soit d'une injection directe dans les tissus, soit d'un traitement de cellules en culture suivi de leur réimplantation *in vivo*, par injection ou greffe.

15 La présente invention fournit ainsi une méthode particulièrement avantageuse pour le traitement de maladies, comprenant l'administration *in vivo* ou *in vitro* d'un acide nucléique apte à corriger ladite maladie associé à un composé de formule générale I dans les conditions définies ci-avant. Plus particulièrement, cette méthode est applicable aux maladies résultant d'une déficience en un produit protéique ou nucléique et l'acide nucléique administré code pour ledit produit protéique ou contient ledit produit nucléique.

20

Elle s'étend à toute utilisation d'une lipopolyamine selon l'invention pour la transfection *in vivo* ou *in vitro* de cellules.

25 La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

ABREVIATIONS ET SYMBOLES

30 AcOEt : Acétate d'éthyle
BOP : Benzotriazol-1-yloxytris (diméthylamino) phosphonium hexafluorophosphate
DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
DCU : Dicyclohexylurée

	DMAP	: 4-Diméthylaminopyridine
	DMF	: Diméthylformamide
	DMSO	: Diméthyle sulfoxyde
	DODA	: Dioctadécylamine
5	EP	: Ether de pétrole
	EtOH	: Ethanol
	NEt ₃	: Triéthylamine
	Rf	: Coefficient de rétention frontal
	TFA	: Acide trifluoroacétique
10	THF	: Tétrahydrofurane
	TMS	: Tétraméthylsilane
	UV	: Ultra-Violets

15

MATERIEL ET METHODES

A. Produits utilisés

La DODA, la NEt₃, le TFA, la L-ornithine, l'hydroxyde de tétraméthylammonium, le nickel de Raney, l'anhydride diglycolique proviennent de chez Fluka ; le BOP, de chez Propeptide France ; la DMAP, le chloroformate d'isobutyle et la N-méthylmorpholine, de chez Aldrich. Le THF provient de chez Merck ; tous les autres solvants utilisés sont des produits RP Prolabo. Les solutions de NaCl, de NaHCO₃ sont saturées ; la solution de KHSO₄ est à 0,5 M.

25

B. Mesures physiques

Les spectres de résonnance magnétique nucléaire du proton (RMN 1H) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au TMS.

30

C. Chromatographies sur silice

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice Merck de 0,2 mm d'épaisseur.

Révélations :

35

- Aux UV (254nm)

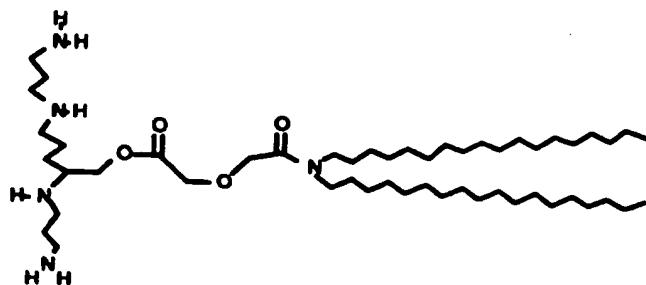
- A la ninhydrine, en vaporisant (spray léger) une solution éthanolique de ninhydrine (40 mg / 100 ml EtOH) pour révéler les amines ou les amides en chauffant à 150°C.

- A la fluorescamine, en vaporisant une solution (40 mg / 100 ml Acétone) pour révéler les amines primaires.
- A l'iode, en recouvrant la plaque de poudre d'iode.

5 Les chromatographies sur colonne ont été effectuées sur gel de silice 60 Merck de granulométrie 0,063-0,200 mm.

EXEMPLE 1.

10 Synthèse du (Dioctadécyl-carbamoylméthoxy)-acétate de 2,5-bis-(3-amino-propylamino)-pentyle.



15

1.a Préparation du 2,5-Bis-(2-cyano-éthylamino)-pentanoate de tétraméthylammonium (1.a)

20 Du monohydrochlorure de l'acide(s)-2,5-diaminopentanoïque (L-ornithine) (6,74g; 40 mmol) et de l'hydroxyde de tétraméthylammonium pentahydraté (14,48g; 80 mmol) sont mis en solution dans du méthanol (20 ml). L'eau formée et le méthanol sont évaporés sous pression réduite (à l'aide d'une pompe à huile) de manière à obtenir un résidu sec.

25 Du N,N-diméthylformamide (30 ml) est ajouté aux sels précédemment obtenus. Le mélange est dégazé avec de l'azote, puis agité fortement pendant dix minutes, ce qui permet au 2,5-diamino pentanoate de tétraméthylammonium de se solubiliser (le chlorure de tétraméthylammonium reste en suspension dans le DMF). L'acrylonitrile (6ml; 85,6 mol) est ajouté goutte à goutte; le ballon se réchauffe légèrement. Le mélange réactionnel est laissé 1h à température ambiante, sous azote.

30 Il est ensuite filtré pour éliminer le chlorure de tétraméthylammonium. Le DMF est

évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est un liquide huileux ; retiré de l'évaporateur rotatif, il se solidifie. De l'acétonitrile (100 ml) est ajouté et le ballon est légèrement chauffé jusqu'à obtention d'une solution translucide. Du THF est ajouté jusqu'à obtention d'une solution trouble. Le ballon est stocké pendant deux jours au

5 congélateur ; le sel de tétraméthyl-ammonium du L-2,5-Bis-(2-cyano-éthylamino)-pentanoïque de l'acide est récupéré par filtration sous forme de solide blanc. Il est rincé au THF sur fritté, puis séché sur P₂O₅. 6,06 g sont obtenus, soit un rendement de 49 % (brut).

10 1.b Préparation du sel de tétraméthyl ammonium de l'acide 2,5-Bis-(3-amino-propylamino)-pentanoïque (1.b)

Le produit 1.a est solubilisé dans un mélange d'éthanol (18 ml), d'eau (2 ml) et de potasse 2 M (5 ml). La solution est purgée à l'argon. Du Nickel de Raney (2 ml de la

15 suspension Fluka) est ajouté. L'hydrogénéation est réalisée dans une autoclave, purgée à l'azote, à 26°C. En 3h, la pression est passée de 50,6 bars à 44,7 bars, puis s'est stabilisée plus d'une heure. L'autoclave fait 250 ml et le mélange réactionnel, 30 ml. La suspension obtenue est filtrée, rincée à l'eau et passée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaune est obtenue. Le test à la fluorescamine est positif.

20

1.c Préparation de l'acide 2,5-Bis-(tert-butoxycarbonyl-[3-(tert-butoxycarbonyl-amino)-propyl-amino]-pentanoïque (1.c)

25 Le produit 1.b est dissous dans du dioxane (30 ml). Du ditertbutyldicarbonate (17,46g ; 80 mmol) est ajouté goutte à goutte. Le mélange est agité pendant une nuit. Le dioxane est évaporé. Du KHSO₄ est ajouté. Le produit est extrait par CHCl₃ (3 x 100 ml). La phase organique est ensuite lavée successivement avec NaHCO₃ (pH=7,5), NaCl, puis séchée sur MgSO₄ et évaporée sous pression réduite. 10 g de produit sont obtenus (15,4 mmol, soit un rendement de 39% par rapport à l'ornithine).

CLHP : MeCN/H₂O: 0-3 min 50 % MeCN; 3-20 min 50-100 % MeCN, 20-40 min 100 % MeCN, K'= 7.96 (Colonne RP-18, debit=1 ml/min)

CCM : Rf (CHCl₃ : AcOEt ; 95 : 5 (v : v)) =0,28

RMN(ppm) : 1,3 (m, 8H, N+CH₂-CH₂-CH₂-CHN+COO/ 2x N+CH₂CH₂CH₂N+); 2,7-3,0 (m, 10H 5x N+CH₂); 3,8 (t, 1H, N+CHCOO)

MS : MH⁺= 647, (PM= 646)

5 1.d Préparation du 2,5-Bis-(tert-butoxycarbonyl-[3-(tert-butoxycarbonylamino)-propyl-amino]-pentan-1-ol (1.d)

La L-5-carboxytétratert-butoxycarbonylsperrmine (1,94g; 3 mmol) est dissoute dans 30 ml de THF. 370 ml (3,1 mmol) de N-méthylmorpholine sont introduits à la micropipette. Le mélange réactionnel, mis sous azote, est refroidi à -15°C (dans un bain de carboglace et d'éthylène glycol) ; 390 ml (3,1 mmol) de chloroformate d'isobutyle sont alors ajoutés. Au bout de trois minutes, le mélange réactionnel est versé dans un becher contenant le NaBH₄ (2g) dissous dans 20 ml d'eau à 4°C. Le THF est évaporé. Du KHSO₄ est ajouté (jusqu'à pH=7). Le produit est extrait à l'AcOEt, rincé au NaHCO₃, NaCl, séché sur MgSO₄, filtré puis évaporé. 1,15g sont obtenus, soit un rendement de 61%.

La CCM conduit à deux tâches ; une séparation sur colonne de silice, avec le même éluant, est donc réalisée et conduit à 0,97g de produit (huile jaune). Le rendement de la séparation est de 84 %.

20 Le rendement de la réduction est de 51 %.

CCM : Rf (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,24

RMN (ppm) : 1,42 (s, 4xBoc); 1,5-1,7 (m, 8H N+CH₂-CH₂-CH₂-CHN/ 2x N+CH₂CH₂CH₂N); 2,85-3,2 (m, 10H 5x NCH₂), 3,4 (m, 1H, NCHCH₂OH), 3,7 (d, 2H, CH₂OH), 6,8 (m, 2H; NH)

25 MS : MH⁺= 633, PM= 632

1.e Préparation de l'acide 2,5-Bis-[3-(tert-butoxycarbonylamino)-propyl-[tert-butoxycarbonylamino]-pentyloxycarbonylméthoxy-acétique (1.e)

30 0,51 g (0,806 mmol) du produit 1.d sont dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂ ; 2 équivalents d'anhydride diglycolique (1,535 mmol ; 0,178 g), 2,2 équivalents de triéthylamine (1,687 mmol ; 235 µl) ainsi que 5 mg de DMAP sont ajoutés. Au bout d'une heure, la C.C.M. montrant que l'alcool a réagi, le mélange est additionné de CH₂Cl₂, puis lavé par 3 x 50 ml de KHSO₄, 3 x 50 ml de NaCl, séché sur MgSO₄, filtré puis évaporé. 0,26 g de solide sont obtenus, soit un rendement de 43 %.

CCM : Rf (CHCl₃ : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)) = 0,75

MS: MH⁺ = 749, P.M. = 748

5 1.f. Préparation du Dioctadecyl-carbamoylmethoxy)-acétate du 2-5-bis-(tert-
butoxycarbonyl-[3-(tert-butoxycarbonyl-amino)-propyl-amino]-pentyle (1.f)

0,123 g de produit précédent (0,164 mmol), 1 équivalent (0,0856g) de dioctadécyamine, 3 équivalents de triéthylamine (68,4 ml), 1,1 équivalent (0,0798 g)

10 de BOP sont dissous dans du CHCl₃. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante. Au bout de deux heures, le mélange est additionné de 100 ml de CH₂Cl₂, puis lavé par 3 x 100 ml de KHSO₄, de NaHCO₃, de NaCl (jusqu'à pH=7), séché, puis évaporé. 0,13 g de produit sont obtenus, soit un rendement de 63 %.

CCM : Rf (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,62 ; révélation à l'iode, à la ninhydrine et à la fluorescamine.

RMN (ppm): 0.90 (t, J=7.5 Hz, 6H: CH₃, 1.20-1.75 (m, 108 H: CH₂ / C(CH₃)₃), 3.05-3.35 (m, 14 H: CH₂N), 4.15-4.35 (m, 3 H: NCHCH₂OCO), 4.23-4.27 (2s, 2x 2H: OCH₂CO), 4.5-5.5 (m, étalé, 2 H: NH)

MS: MH⁺ = 1252, P.M. = 1251

20 Analyse élémentaire : Formule brute : C₇₁H₁₃₇N₅O₁₂

% théoriques : C 68,06 H 11,02 N 5,59

% obtenus : C 67,14 H 11,93 N 5,86

1.g. Préparation du (Dioctadecyl-carbamoylmethoxy)-acétate de 2-5-bis-(3-amino-

25 propylamino)-pentyle (1.g)

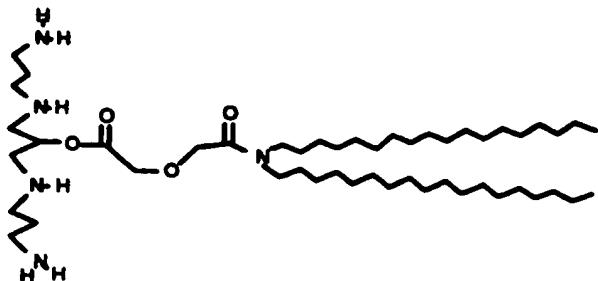
1 ml de TFA est ajouté à 0,025 g de produit 1.f (0,02 mmol) dans un tube "Eppendorf" ® de 1,5 ml et laissé une heure à température ambiante. Le TFA est évaporé.

30 500 µl d'éthanol sont ajoutés de façon à obtenir une solution à 40 mM, nécessaire pour les tests biologiques.

MS : MH⁺ = 852, P.M. = 851

35 **EXAMPLE 2.**

Préparation du (Dioctadécy carbamoylméthoxy)-acétate de 1,3-bis-(3-amino-propylamino)-2 propyle (2.f.):



5

2.a Préparation du 1,3-Bis-(2-cyano-éthylamino)-propan-2-ol (2.a)

3.6 g (40 mmol) de 1,3-diaminopropan-2-ol sont dissous dans 75 ml de méthanol. 5,76 ml (80 mmol) d'acrylonitrile sont ajoutés en 15 minutes. Le test à la fluorescamine est positif. Le mélange réactionnel reste incolore. Il est laissé sous agitation, à température ambiante, pendant la nuit. Le test à la fluorescamine est alors négatif. Le méthanol est évaporé. 7,9 g de produit sont recueillis (rendement de 100 % pour le produit brut).

15 **2.b Préparation du 1,3-Bis-(3-amino-propylamino)-propan-2-ol (2.b)**

L'hydrogénéation est réalisée dans une autoclave, purgée à l'azote, à 27°C.

Le produit 2.a est solubilisé dans un mélange de 15 ml de méthanol, 10 ml d'éthanol, 5 ml de KOH (2 M). La solution est purgée à l'argon et 4 ml de la suspension de nickel de Raney sont ajoutés dans l'autoclave.

En 3h30, la pression est passée de 51,6 bar à 37,6 bar, puis s'est stabilisée plus d'une heure. L'autoclave fait 250 ml et le mélange réactionnel, 30 ml. La suspension obtenue est filtrée, rincée à l'eau et passée à l'évaporateur rotatif. Une huile jaune est obtenue. Le test à la fluorescamine est positif.

25

2.c Préparation du 1,3-Bis-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)2-propan-2-ol (2.c)

Le produit 2.b est protégé de la même façon qu'en 1.c. 100 ml de CH_2Cl_2 sont ajoutés. 39,2 g (179 mmol) de di-tert-butyldicarbonate dissous dans 100 ml de

dioxane sont ajoutés goutte à goutte. La solution est laissée sous agitation pendant 72h. Le solvant est évaporé, du KHSO₄ est ajouté. Le produit est extrait à l'AcOEt (3 x 100 ml) ; les phases sont rassemblées et rincées au KHSO₄, au NaHCO₃, au NaCl, séchées sur MgSO₄ et évaporées. 20 g sont obtenus (rendement de 83 % par rapport au produit initial)

Le produit est cristallisé dans l'EP.

C.C.M. : Rf (EP : AcOEt ; 1 : 1 (v : v)) = 0,23

Rf (EP : AcOEt ; 1 : 2 (v : v)) = 0,63

RMN (ppm) : 1,4 (2s, 36H : 4 x (CH₃)₃) ; 1,65 (qt, 4H : 2 x NCH₂CH₂CH₂NH) ;

10 2,95 (q, 4H : 2 x NHCH₂CH₂) ; 3,1 (2d, 4H : NCH₂CHCH₂N) ; 3,2 (t, 4H : NCH₂CH₂) ; 3,85 (m, 1H : OH) ; 5,9 (s, 2H : NH)

MS : MH⁺=605, PM= 604

2.d Préparation de l'acide 1,3-Bis-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)2-propyl-2-éthoxycarbonylméthoxy-acétique (2.d.)

604 mg (1mmol) de produit 2.c. sont dissous dans 20 ml de CH₂Cl₂. 2 équivalents d'anhydride (2 mmol ; 0,232 g), 2,2 équivalents de NEt₃ (307 µl, puis 100 µl), 6,5 g de DMAP sont introduits. Après 24 h d'agitation à température ambiante, le mélange

20 est additionné de CH₂Cl₂, lavé au KHSO₄, au NaCl, séché sur MgSO₄, filtré puis évaporé. 0,156 g de produit sont obtenus (rendement de 22 %).

CCM : Rf (CHCl₃ : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)) =0,71

RMN (ppm) : 1,2-1,4 (2s, 36H : 4 X (CH₃)₃) ; 1,5 (m, 4H : 2 x NHCH₂CH₂CH₂N) ; 2,85 (q, 4H : 2 x NHCH₂CH₂) ; 3,1 (m, 8H : 4 x NCH₂) ; 3,9-4,2 (2s, 4H : 2 x

25 OCH₂COO) ; 5,25 (m, 1H : CH₂CHCH₂) ; 6,7 (2H : NH)

MS : MH⁺= 721, PM= 720

2.e Préparation du (Dioctadécy carbamoylméthoxy)- acétate du 1,3-Bis-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)2-propyle (2.e)

30

0,216 mmoles de l'acide 2.d sont dissoutes dans 3 ml de CHCl₃. 1 équivalent de DODA (0,113 g), 3 équivalents de NEt₃ (100 µl) et 1,1 équivalent de BOP (0,11 g) sont ajoutés. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h.

Le CHCl₃ est évaporé. 100 ml d'AcOEt sont ajoutés. La phase organique est lavée par de l'HCl (0,5 M), par NaHCO₃, par NaCl jusqu'à pH=7, séchée sur MgSO₄ puis

35

évaporée. 0,185 g sont obtenus (rendement 70 %). Une colonne sur silice est réalisée. 110 mg de produit sont recueillis (rendement 42 %).

CCM : R_f ($CHCl_3 : MeOH : AcOH ; 90 : 8 : 2 (v : v : v)$) = 0,81

R_f (EP : $AcOEt$; 1 : 1 (v : v)) = 0,67

5

RMN (ppm) : 0,85 (t, 6H : 2 x CH_3) ; 1,20-1,55 (m, 100H : $CH_2/C(CH_3)_3$) ; 1,6 (m, 4H : 2 x $NHCH_2CH_2CH_2N$) ; 3,05-3,4 (m, 16H : 2 x $NHCH_2CH_2CH_2N$ / NCH_2CHCH_2N / 2 x CH_2N) ; 4,1 (s, 2H : $NCOCH_2O$) ; 4,15 (s, 2H : OCH_2COO) ; 5,25 (m, 1H : CH_2CHCH_2) ; 6,15 (m, 2H : NH)

10 MS : $MH^+ = 1224$, P.M. = 1223

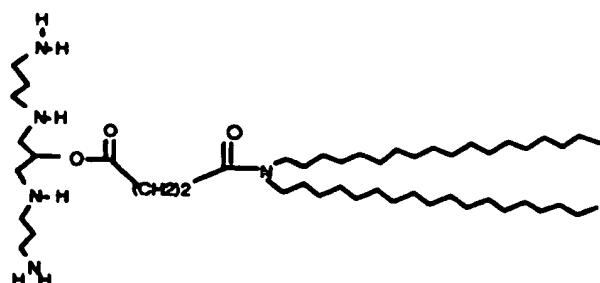
2.f Préparation du (Dioctadécyl-carbamoylmethoxy)-acétate de 1,3-Bis-(3-tert-butoxycarbonyl-amino-(tert-butoxycarbonyl-aminopropyl)2-propyle(2.f.):

15 1 ml de TFA est ajouté à 0,0247 g de produit 2.e (0,021mmol) dans un tube "Eppendorf" ® de 1,5 ml et laissé une heure à température ambiante. Le TFA est évaporé.
505 µl d'éthanol sont ajoutés de façon à obtenir une solution à 40 mM, nécessaire pour les tests biologiques.

20 MS : $MH^+ = 824$, P.M. = 823

EXEMPLE 3 : Préparation du (N,N-Dioctadécyl)-succinamate de 2-(3-amino-propylamino)-1-(3-amino-propylamino-methyl)-éthyle

25



Ce composé est préparé selon le protocole décrit précédemment en exemple 2, en substituant à l'acide diglycolique, l'acide succinique.

L'analyse en spectrométrie de masse du produit ainsi obtenu indique un fragment MH^+ de 808, ce qui est conforme à la masse attendue.

UTILISATION DE LIPOPOLYAMINES SELON L'INVENTION POUR LA TRANSFECTION IN VITRO DE MATERIEL GENETIQUE

5

A Plasmides utilisés pour le transfert de gènes in vitro

On utilise le plasmide pCMV-LUC. Il s'agit d'une construction comportant le gène rapporteur "luciférase", dérivée soit du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega) soit 10 du plasmide pGL2-Control Vector (Promega) par insertion d'un fragment Mlu I-Hind III contenant le promoteur du Cytomegalovirus humain (CMV), extrait du plasmide vecteur pcDNA3 (Invitrogen).

B Protocole de préparation des solutions utilisées pour la transfection

15

Des lipopolyamines préparées selon des exemples précédents sont mises en solution à 40 mM dans l'éthanol puis dilués dans un mélange éthanol/eau en maintenant une concentration éthanolique inférieure à 10%.

Les solutions d'acide nucléique à transfecter sont diluées en sérum physiologique 20 (NaCl 0,15M) puis ajoutées aux solutions de lipopolyamine, dans un rapport 1/1 (v/v). Après homogénéisation au vortex et incubation 15 minutes à température ambiante, les solutions ADN/lipopolyamine sont distribuées à 9% (v/v) final dans les puits où les cellules ont été lavées par du milieu de culture dépourvu de protéines (sérum).

25 **EXEMPLE 4 :**

Influence du rapport de charge (amines/phosphates) sur l'efficacité de transfection.

Des échantillons de 1.10^5 cellules NIH 3T3 en phase exponentielle de croissance sur 2 30 cm^2 sont traités par des solutions lipopolyamines/pCMV-LUC, présentant des rapports de charges variables, pendant 4 heures à 37°C sous 5% CO_2 ; chaque échantillon reçoit 1 μg d'acide nucléique. La recherche de l'expression du gène reporter est effectuée après addition de sérum de veau foetal à 8% final suivie d'une incubation de 40 heures dans l'étuve à CO_2 .

L'activité luciférase est dosée par l'émission de lumière [RLU = relative light unit] en 35 présence de luciférine, coenzyme A et ATP pendant 20 secondes et rapportée au μg de

protéine dans le surnageant obtenu après lyse des cellules. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau I ci-dessous.

5

rapport de charge	Lipopolyamine de l'exemple 1		Lipopolyamine de l'exemple 2	
	luminescence	coef. de var. (%)	luminescence	coef. de var. (%)
1	69	5	23	34
2	5091	3	252	6
4	3636	30	7890	3
6	21334	3	61401	5
8	40846	3	73224	2
10	55321	1	77633	2
12	53239	5	48634	5
14	36	10	52417	2
ADN seul	52	5		

TABLEAU I

10

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois essais indépendants. Cette expérience montre clairement que les lipopolyamines selon l'invention permettent le transfert de gènes dans les conditions requises pour leur expression.

15 **EXAMPLE 5 :**

Influence de la concentration en acide nucléique dans les mélanges ADN/lipopolyamine.

20 Selon le même protocole que celui décrit dans l'exemple précédent les cellules NIH 3T3 sont traitées avec des mélanges ADN/lipopolyamines dans les conditions où différentes concentrations d'ADN sont utilisées pour un même rapport de charge. Dans ce cas, l'activité luciférase est mesurée pendant 20 secondes et rapportée à $2,5 \cdot 10^3$ cellules traitées. Les résultats sont présentés en tableaux II et III ci-dessous.

Lipopolyamine de l'exemple 1

$\mu\text{g DNA}$	Rapport de charge			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	27 (19)	25 (20)	32 (31)	36 (15)
0,5	23 (5)	37 (54)	4476 (4)	4811 (19)
1,0	4945 (12)	19194 (14)	30933 (21)	39357 (3)
2,0	93937 (2)	105533 (1)	111167 (14)	8315 (15)
3,0	106293 (11)	100093 (8)	53475 (12)	
4,0	98553 (10)	69863 (8)		

5

TABLEAU II

10 Lipopolyamine de l'exemple 2

$\mu\text{g DNA}$	Rapport de charge			
	x 4	x 6	x 8	x 10
0,25	40 (17)	52 (64)	122 (14)	51 (5)
0,5	28 (10)	204 (25)	36533 (7)	44473 (7)
1,0	3427 ((12)	48167 (13)	49363 (13)	50083 (9)
2,0	33377 (13)	44697 (18)	30670 (16)	9544 (4)
3,0	9686 (3)	31557 (2)	9157 (8)	
4,0	4321 (9)	40105 (10)		

TABLEAU III

15 Chaque valeur correspond à la moyenne de trois essais indépendants.
 Les valeurs portées entre parenthèses correspondent au coefficient de variation exprimé en %.

REVENDICATIONS

1. Lipopolyamine sous forme D, L, ou DL ou l'un de ses sels caractérisée en ce
5 qu'elle est représentée par la formule générale I



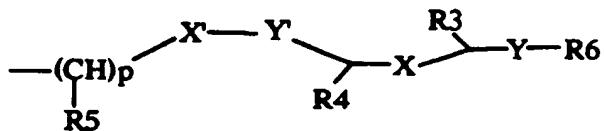
II

10 dans laquelle

- m est un nombre entier compris entre 2 et 6 inclusivement,
- n est un nombre entier compris entre 1 et 9 inclusivement et plus préférentiellement entre 1 et 5 avec, lorsque n est compris entre 2 et 9, un seul groupement R, différent de l'hydrogène, de présent dans la formule générale et des valeurs de m variables ou identiques au sein des différents groupements $-\text{CH}_m-$ ou $-\text{CH}_2\text{R}_m-$.

15 R

- R représente un atome d'hydrogène ou un radical de formule générale II:



20

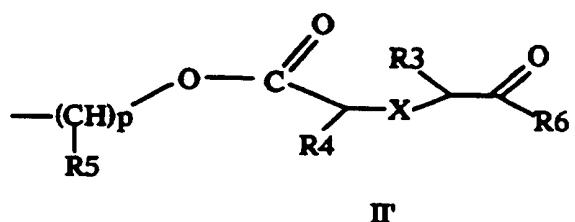
11

dans laquelle

25 - X et X' représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'oxygène, un groupement méthylène $-(\text{CH}_2)_q-$ avec q égal à 0, 1, 2 ou 3, ou un groupement amino $-\text{NH}-$ ou $-\text{NR}'-$ avec R' représentant un groupement alkyle en C_1 à C_4 ,
- Y et Y' représentent indépendamment l'un de l'autre un groupement méthylène, un groupement carbonyle ou un groupement $\text{C}=\text{S}$,
30 - R_3 , R_4 et R_5 représentent indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène ou un radical alkyle, substitué ou non, en C_1 à C_4 , avec p pouvant varier entre 0 et 5,

- R_6 représente un dérivé du cholestérol ou un groupement alkyle amino -NR₁R₂ avec R₁ et R₂ représentant indépendamment l'un de l'autre un radical aliphatique, saturé ou non, linéaire ou ramifié en C₁₂ à C₂₂.

5 2. Lipopolyamine selon la revendication 1 caractérisé en ce que R y est représenté de préférence par la formule générale II'

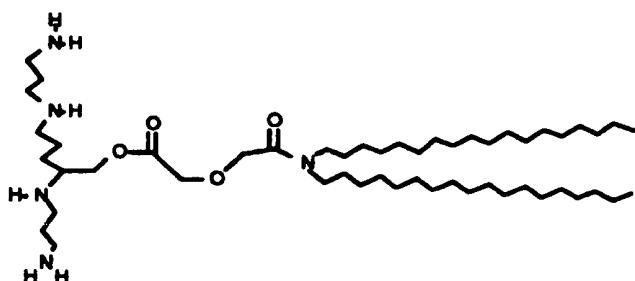


10

dans laquelle R₃, R₄, R₅, R₆ et p répondent aux définitions proposées en revendication 1 et X représente un atome d'oxygène ou un groupement -(CH₂)_q- avec q étant égal à zéro.

15

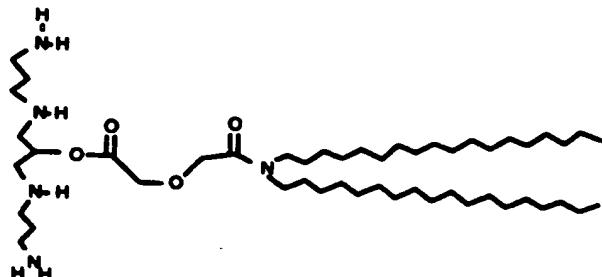
3. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du



20 sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

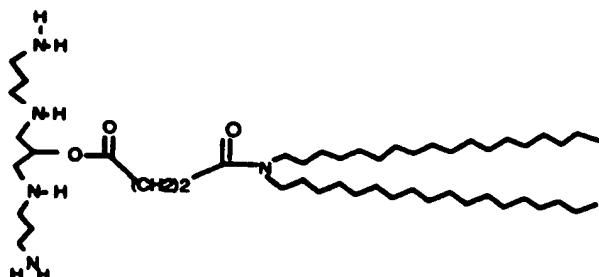
4. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du

25



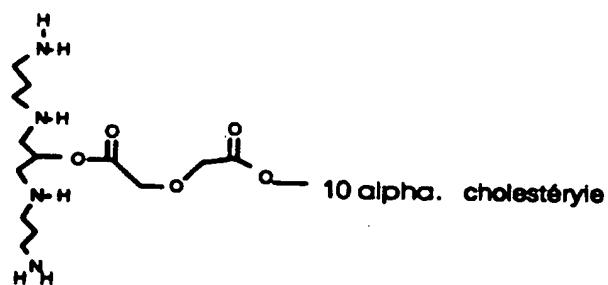
sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

5 5. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du



10 sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

6. Lipopolyamine selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce qu'il s'agit du



15

sous forme D, L, DL ou l'un de ses sels.

20 7. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle contient au moins une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et au moins un acide nucléique.

8. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide désoxyribonucléique.
9. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un acide ribonucléique.
- 5 10. Composition selon la revendication 7, 8 ou 9 caractérisée en ce que l'acide nucléique est modifié chimiquement.
11. Composition selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique est un antisens.
- 10 12. Composition selon l'une des revendications 7 à 10 caractérisée en ce que l'acide nucléique comporte un gène thérapeutique.
13. Composition selon la revendication 12 caractérisée en ce que le gène thérapeutique code pour une protéine impliquée dans le métabolisme des lipides comme par une apolipoprotéine choisie parmi les apolipoprotéines A-I, A-II, A-IV, B, C-I, C-II, C-III, D, E, F, G, H, J et apo(a), une enzyme telle la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique 15 ou autres lipases, la lécithine cholestérol acyltransférase, la 7 alpha cholestérol hydroxylase, la phosphatidique acide phosphatase, une protéine de transfert de lipides comme la protéine de transfert des esters de cholestérol et la protéine de transfert des phospholipides, une protéine de liaisons des HDL ou encore un récepteur choisi par exemple parmi les récepteurs LDL, récepteurs des chylomicrons-remnants et les 20 récepteurs scavenger.
14. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique, une lipopolyamine selon l'une des revendications 1 à 6 et un adjuvant capable de s'associer au complexe lipopolyamine/acide nucléique et d'améliorer son pouvoir transfectant.
15. Composition selon la revendication 14 caractérisée en ce que l'adjuvant est un ou 25 plusieurs lipides neutres.
16. Composition selon la revendication 15 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi les lipides synthétiques ou naturels, zwitterioniques ou dépourvus de charge ionique dans les conditions physiologiques.

17. Composition selon la revendication 16 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont des lipides à 2 chaînes grasses.
18. Composition selon la revendication 17 caractérisée en ce que le ou les lipides neutres sont choisis parmi la dioléoylphosphatidyléthanolamine (DOPE), l'oléoyl-palmitoylphosphatidyléthanolamine (POPE), le di-stéaroyl, -palmitoyl, -mirystoyl phosphatidyléthanolamine ainsi que leurs dérivé N-méthylés 1 à 3 fois; les phosphatidylglycérols, les diacylglycérols, les glycosyldiacylglycérols, les cérébroside (tels que notamment les galactocérébroside), les sphingolipides (tels que notamment les sphingomyélines) et les asialogangliosides (tels que notamment les asialoGM1 et GM2).
19. Composition selon l'une des revendications 14 à 18 caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,1 à 20 équivalents d'adjuvant pour 1 équivalent de lipopolyamine, et, plus préférentiellement, de 1 à 5.
20. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable.
21. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 19 caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une application sur la peau et/ou les muqueuses.
22. Utilisation d'une lipopolyamine selon l'une des revendications de 1 à 6 pour la transfection *in vivo* ou *in vitro* de cellules.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 95/01595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C07C235/06 C07C233/05 C07J9/00 A61K47/48 A61K48/00
 C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 394 111 (CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 October 1990 see page 5, line 36 - page 6, line 10; claims; examples ---	1-22
A	WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 17 March 1994 see page 4, line 25 - page 5, line 8 see page 6, line 5 - page 8, line 19 ---	1-22
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 86, September 1989 WASHINGTON US, pages 6982-6986, J.-P. BEHR ET AL. 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' see the whole document ---	1-22

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- 'Z' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

29 March 1996

Date of mailing of the international search report

10.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tz. 31 651 epc nl.
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Seufert, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

SEARCH

Intern'l Application No
PCT/FR 95/01595

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 6, 1994 WASHINGTON US, pages 647-654, J.-P. BEHR ET AL. 'Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules' see the whole document ---	1-22
A	TETRAHEDRON LETTERS, vol. 27, no. 48, 1986 OXFORD GB, pages 5861-5864, J. P. BEHR 'DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants' ---	1-22
X	FR,A,2 066 157 (BASF) 6 August 1971 see page 5, line 6 - line 9 see page 5, line 34 - line 40 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01595

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR95/01595

Compared with the original claim 1 as filed, the present claim 1 is not very clear. In the view of the Searching Authority the definition of the substituents now allows for compounds I wherein $n = 1$ and $R = H$. These compounds are obviously not novel, nor are they lipopolyamines (see DE-A-1 953 263; compounds wherein $m = 3-5$ are also known).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 95/01595

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866 CA-A- 2014518 FR-A- 2646161 IL-A- 94077 JP-A- 2292246 US-A- 5476962 US-A- 5171678	19-10-90 17-10-90 26-10-90 29-12-94 03-12-90 19-12-95 15-12-92
WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761 EP-A- 0656883	02-08-94 14-06-95
FR-A-2066157	06-08-71	DE-A- 1953263 BE-A- 757840 CA-A- 918678 GB-A- 1319495 NL-A- 7015579 US-A- 4014933 US-I- B391828	17-02-72 22-04-71 09-01-73 06-06-73 27-04-71 29-03-77 06-04-76

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 95/01595

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C07C235/06 C07C233/05 C07J9/00 A61K47/48 A61K48/00
C12N15/88

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications vues
A	EP,A,0 394 111 (CENTRE NATIONALE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) 24 Octobre 1990 voir page 5, ligne 36 - page 6, ligne 10; revendications; exemples ---	1-22
A	WO,A,94 05624 (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 17 Mars 1994 voir page 4, ligne 25 - page 5, ligne 8 voir page 6, ligne 5 - page 8, ligne 19 ---	1-22
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 86, Septembre 1989 WASHINGTON US, pages 6982-6986, J.-P. BEHR ET AL. 'Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA' voir le document en entier ---	1-22

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *'B' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *'O' document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré seulement
- *'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *'Z' document qui fait partie de la même famille de brevets

1 Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10.04.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Europeen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Seufert, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01595

C(ritique) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Caractére	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 5, no. 6, 1994 WASHINGTON US, pages 647-654, J.-P. BEHR ET AL. 'Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules' voir le document en entier ---</p>	1-22
A	<p>TETRAHEDRON LETTERS, vol. 27, no. 48, 1986 OXFORD GB, pages 5861-5864. J. P. BEHR 'DNA strongly binds to micelles and vesicles containing lipopolyamines or lipointercalants'</p>	1-22
X	<p>FR,A.2 066 157 (BASF) 6 Août 1971 voir page 5, ligne 6 - ligne 9 voir page 5, ligne 34 - ligne 40 -----</p>	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR95/01595

Cadre I Observations - lorsque'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^o se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

Objet de la demande internationale n°
Nom et adresse de l'administration
Domicile de l'administration

2. Les revendications n°^o se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

3. Les revendications n°^o sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Objet de la demande internationale n°
Nom et adresse de l'administration
Domicile de l'administration

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:

4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR PCT/ISA/

En comparaison avec la revendication 1 du premier dépôt la revendication 1 du présente demande n'est pas très claire. Selon l'opinion de l'examinateur de recherche la définition des substituants permet maintenant des composés I avec $n=1$ et $R=H$. Ces composés ne sont évidemment ni nouveaux ni lipopolyamines (voir DE1953263; composés avec $m = 3-5$ sont aussi connus).

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale N°
PCT/FR 95/01595

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0394111	24-10-90	FR-A- 2645866 CA-A- 2014518 FR-A- 2646161 IL-A- 94077 JP-A- 2292246 US-A- 5476962 US-A- 5171678	19-10-90 17-10-90 26-10-90 29-12-94 03-12-90 19-12-95 15-12-92
WO-A-9405624	17-03-94	US-A- 5334761 EP-A- 0656883	02-08-94 14-06-95
FR-A-2066157	06-08-71	DE-A- 1953263 BE-A- 757840 CA-A- 918678 GB-A- 1319495 NL-A- 7015579 US-A- 4014933 US-I- 8391828	17-02-72 22-04-71 09-01-73 06-06-73 27-04-71 29-03-77 06-04-76

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

BLACK BORDERS

IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

FADED TEXT OR DRAWING

BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

SKEWED/SLANTED IMAGES

COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

GRAY SCALE DOCUMENTS

LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)